

Elucigene® CF-EU2v1 Mode d'emploi

Code cat. : **CF2EUB2 –** 50 tests
CF2EUBX – 10 tests

IVD Dispositif de diagnostic in vitro

Fabriqué par Elucigene Diagnostics
Elucigene Diagnostics
Greenheys House
Pencroft Way
Manchester Science Park
Manchester
M15 6JJ



Pour joindre le service des ventes, le service à la clientèle et le service technique :
T: +44 (0) 161 669 8122
F: +44 (0) 161 669 8129
E: enquiries@elucigene.com
E: techsupport@elucigene.com

Elucigene Diagnostics is the trading name of Delta Diagnostics (UK) Limited, a company registered in England and Wales, registration number 8696299.

Elucigene CF-EU2v1

Usage prévu

Détection qualitative simultanée in vitro des mutations suivantes du gène du régulateur de la perméabilité transmembranaire de la fibrose kystique (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator, CFTR) dans de l’ADN extrait à partir d’échantillons de sang total (préservé par EDTA) et de spots de sang séché.

Traditionnel	Selon les recommandations du HGVS *	
	cDNA name	Protein name
CFTRdele2,3	c.54-5940_273+1025del (c.54-5940_273+10250del21080)	
E60X	c.178G>T	p.Glu60X
P67L	c.200C>T	p.Pro67Leu
G85E	c.254G>A	p.Gly85Glu
394delTT	c.262_263del (c.262_263delTT)	p.Leu88IlefsX22
444delA	c.313del (c.313delA)	p.Ile105SerfsX2
R117C	c.349C>T	p.Arg117Cys
R117H	c.350G>A	p.Arg117His
Y122X	c.366T>A	p.Tyr122X
621+1G>T	c.489+1G>T	
711+1G>T	c.579+1G>T	
L206W	c.617T>G	p.Leu206Trp
1078delT	c.948del(c.948delT)	p.Phe316LeufsX12
R334W	c.1000C>T	p.Arg334Trp
R347P	c.1040G>C	p.Arg347Pro
R347H	c.1040G>A	p.Arg347His
A455E	c.1364C>A	p.Ala455Glu
I507del	c.1519_1521del (c.1519_1521delATC)	p.Ile507del
F508del	c.1521_1523del (c.1521_1523delCTT)	p.Phe508del
1677delTA	c.1545_1546del (c.1545_1546delTA)	p.Tyr515X
V520F	c.1558G>T	p.Val 520Phe
1717-1G>A	c.1585-1G>A	
G542X	c.1624G>T	p.Gly542X
S549R(T>G)	c.1647T>G	p.Ser549Arg
S549N	c.1646G>A	p.Ser549Asn
G551D	c.1652G>A	p.Gly551Asp
R553X	c.1657C>T	p.Arg553X
R560T	c.1679G>C	p.Arg560Thr
1811+1.6kbA>G	c.1680-886A>G	
1898+1G>A	c.1766+1G>A	
2143delT	c.2012del (c.2012delT)	p.Leu671X
2184delA	c.2052del (c.2052delA)	p.Lys684AsnfsX38
2347delG	c.2215del (c.2215delG)	p.Val739TyrfsX16
W846X	c.2538G>A	p.Trp846X
2789+5G>A	c.2657+5G>A	
Q890X	c.2668C>T	p.Gln890X
3120+1G>A	c.2988+1G>A	

Traditionnel	Selon les recommandations du HGVS *	
	cDNA name	Protein name
3272-26A>G	c. 3140-26A>G	
R1066C	c.3196C>T	p.Arg1066Cys
Y1092X(C>A)	c.3276C>A	p.Tyr1092X
M1101K	c.3302T>A	p.Met1101Lys
D1152H	c.3454G>C	p.Asp1152His
R1158X	c.3472C>T	p.Arg1158X
R1162X	c.3484C>T	p.Arg1162X
3659delC	c.3528del (c.3528delC)	p.Lys1177SerfsX15
3849+10kbC>T	c.3718-2477C>T	
S1251N	c.3752G>A	p.Ser1251Asn
3905insT	c.3773dup (c.3773dupT)	p.Leu1258PhefsX7
W1282X	c.3846G>A	p.Trp1282X
N1303K	c.3909C>G	p.Asn1303Lys

* *with reference to – Mutation Nomenclature in Practice: Findings and Recommendations from the Cystic Fibrosis External Quality Assessment Scheme. Berwouts S, Morris M, Girodon G, Schwarz M, Stuhrmann M and Dequeker E. Human Mutation, Vol.00, No. 0, 1-7 (2011)*

CF-EU2v1 peut distinguer les personnes hétérozygotes des homozygotes pour l'ensemble des mutations et des variants ci-dessus à l'exception de S549R(T>G) – voir la section Réactivité croisée de ce document.

Résumé et explication

La mucoviscidose (MV) est la maladie autosomique récessive limitant la durée de vie la plus fréquente dans la population caucasienne. L'incidence de la maladie est de 1:3 200 naissances vivantes chez les Caucasiens (1). Dans la population caucasienne, la fréquence hétérozygote est d'environ 1:25.

La mucoviscidose affecte l'épithélium de plusieurs organes et résulte en une pathologie multisystème complexe impliquant le pancréas exocrine, l'intestin, les voies respiratoires, les voies génitales masculines, le système hépatobiliaire et les glandes sudoripares exocrines. L'expression de la maladie varie selon la sévérité des mutations du gène *CFTR* (2), les modificateurs génétiques (3) et les facteurs environnementaux (4). Elle s'étend du décès dans la petite enfance en conséquence d'une pneumopathie obstructive évolutive avec bronchectasie, à une insuffisance pancréatique avec une pneumopathie obstructive graduellement évolutive au cours de l'adolescence et une augmentation de la fréquence d'hospitalisation en raison d'une pneumopathie chez l'adulte jeune, à la sinusite et la bronchite récurrente ou l'infertilité masculine au début de l'âge adulte.

Le diagnostic de la mucoviscidose est le plus souvent établi chez les personnes présentant un ou plusieurs signes phénotypiques caractéristiques de la MV avec la preuve d'une anomalie de fonctionnement du CFTR basée sur l'un des éléments suivants : présence de deux mutations pathogènes sur le gène CFTR ou de deux valeurs quantitatives anormales de chlorure dans la sueur mesurées par ionophorèse dans le test à la pilocarpine (> 60 mEq/l)ou de mesures de différence de potentiel nasal transépithélial caractéristiques de la MV. La fréquence de détection de la mutation du gène CFTR dépend de la méthode d'analyse et du contexte ethnique. Chez certaines personnes symptomatiques, une seule ou aucune mutation pathogène n'est détectable. Chez certains porteurs, la mutation pathogène n'est pas détectable.

Les troubles liés au CFTR sont héréditaires d'une manière autosomique récessive. Les frères et sœurs d'un proposant atteint de mucoviscidose ont 25 % de probabilité d'être touchés, 50 % de probabilité d'être porteurs asymptomatiques et 25 % de probabilité de n'être nitouchés ni porteurs. L'analyse en génétique moléculaire de la ou des mutations pathogènes dans le gène CFTR est utilisée pour la détection des porteurs lors des programmes de dépistage dans la population. Il est possible de procéder à une analyse prénatale pour les grossesses présentant un risque accru de troubles liés au gène CFTR, si des mutations pathogènes sont connues dans la famille.

Depuis la découverte du gène CFTR en 1989 (5), plus de 1 700 mutations et variants du gène ont été décrits (6). Beaucoup de ces mutations sont « privées », et ont été décrites chez un seul patient et/ou dans une seule famille. L'analyse de routine de toutes les mutations possibles n'est ni réalisable ni rentable et elle est donc restreinte aux mutations les plus fréquentes. CF-EU2v1 est un kit d'analyse de la mucoviscidose, conçu spécialement pour étudier les mutations les plus fréquentes retrouvées dans les populations d'origine européenne. Le test identifie un total de 50 mutations et analyse également le tractus de poly-T dans l'intron 9, par une mesure précise des répétitions TG adjacentes.

Le tractus polymorphe de thymidine, à la jonction de l'intron 9 et de l'exon 10, influence la transcription. Le nombre de résidus thymidine (5T, 7T ou 9T) influence l'efficacité de l'épissage de l'exon 10. En présence de l'allèle 5T, une partie de transcrits de l'exon 10 sera absente, résultant en une protéine non fonctionnelle et des symptômes variables de MV. Il est rapporté que le nombre de répétitions TG à l'extrémité 5' du tractus polythymidine peut également influencer l'épissage de l'exon 10 (7). Si celles-ci sont présentes sur le même allèle que le variant 5T, plus le nombre de répétitions TG est élevé, plus la proportion de transcrits CFTR manquants d'exon 10 sera élevée. Le nombre de répétitions TG peut être déterminé à l'aide du kit CF-EU2v1, en mesurant les pics de l'amplicon 5T.

Principes de la procédure

La méthode utilisée par le kit Elucigene CF-EU2v1 utilise la technologie fluorescente d'amplification spécifique d'allèle ARMS (système de mutation réfractaire à l'amplification, Amplification Refractory Mutation System), qui détecte les mutations ponctuelles, les insertions ou les délétions sur l'acide désoxyribonucléique (ADN) (8). Le principe de l'ARMS est que les oligonucléotides avec un résidu discordant en 3' ne fonctionneront pas comme amorces de PCR (Polymerase Chain Reaction) dans des conditions particulières. La sélection d'oligonucléotides appropriés permet d'amplifier et de détecter des séquences d'ADN mutantes ou normales spécifiques. Les séquences amplifiées (amplicons) sont séparées par électrophorèse capillaire en utilisant un analyseur génétique Applied Biosystems. Le logiciel d'analyse permet d'identifier et d'étiqueter les amplicons en fonction de leur taille et couleur de fluorochrome.

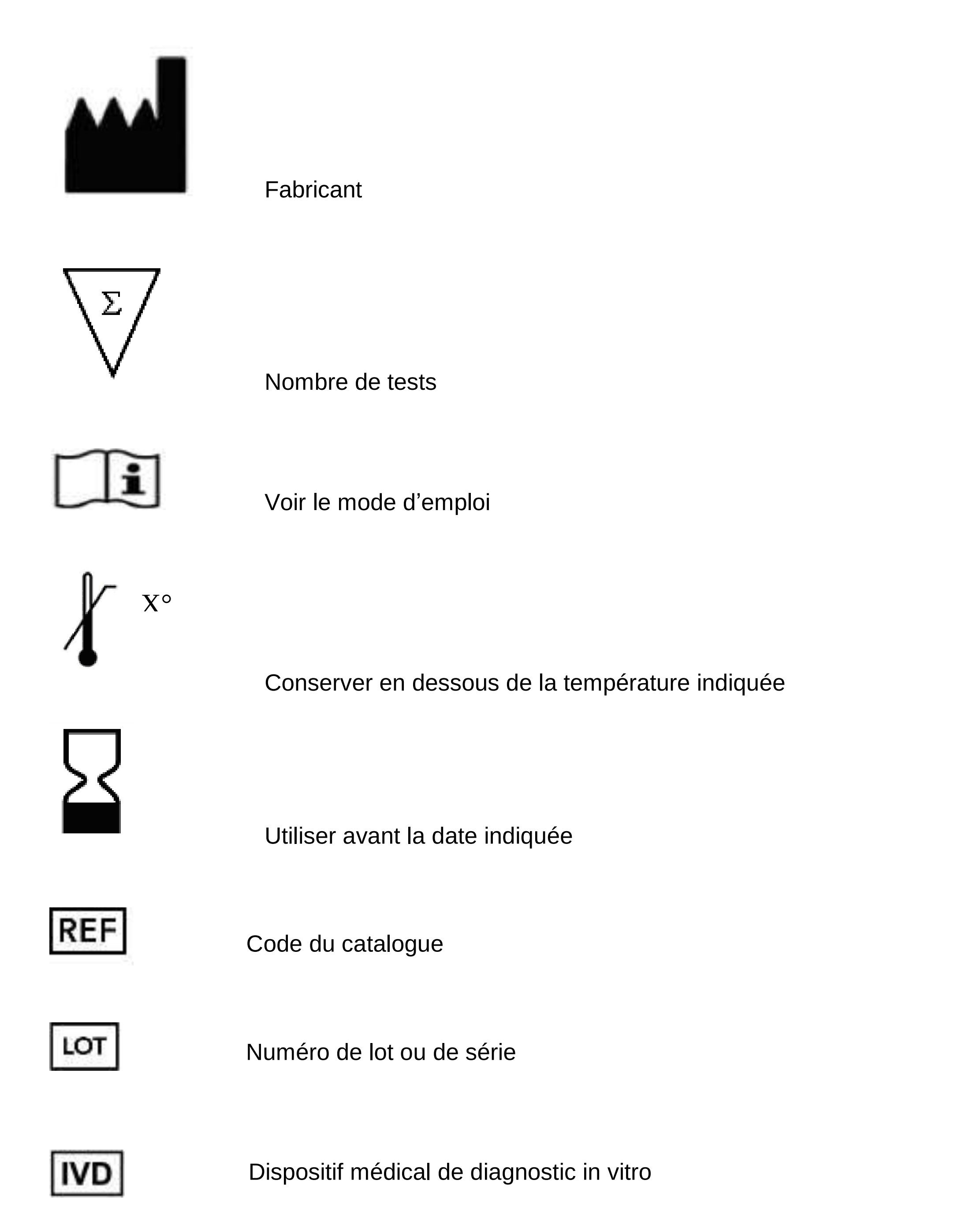
Elucigene CF-EU2v1 est un test fortement multiplexé comportant deux réactions par PCR (A et B). Cinquante séquences mutantes au sein du gène CFTR sont détectées dans le mélange A et sont visualisées sous forme de pics d'amplicon bleus. Les séquences normales non mutantes correspondantes (type sauvage) sont détectées dans le mélange B et sont visualisées sous forme de pics d'amplicon verts. Le mélange A détecte également la séquence normale pour la mutation la plus fréquemment observée à l'origine de la mucoviscidose chez les populations caucasiennes, appelée F508del, et visualisée sous forme de pic d'amplicon vert. De plus, les séquences répétées de polyT sont détectées dans le mélange A et visualisées sous forme de pics d'amplicon noirs. Les marqueurs du contrôle d'amplification interne (non mucoviscidose) sont inclus dans les mélanges A et B pour surveiller l'efficacité de l'amplification des échantillons et sont visualisés sous forme de pics d'amplicon rouges.

Avertissements et precautions

1. Le contrôle ADN fourni avec ce kit est d'origine humaine. Il a été testé de manière indépendante par une méthode basée sur la PCR et trouvé négatif pour le virus de l'hépatite B (VHB), le virus de l'hépatite C (VHC) et le virus de l'immunodéficience humaine 1 (VIH1).
2. Il est important de manipuler le matériel d'origine humaine avec précaution. Tous les échantillons doivent être considérés comme représentant un risque possible d'infection. Aucune méthode d'analyse ne peut garantir totalement l'absence du VHB, du VHC, du VIH1 ou autres agents infectieux.
3. La manipulation des échantillons et des composants du test, leur utilisation, leur stockage et leur élimination doivent respecter les procédures définies par les recommandations ou les réglementations nationales appropriées de sécurité biologique.
4. Conformément aux bonnes pratiques de laboratoire actuelles, les laboratoires doivent traiter leurs propres échantillons internes de CQ de génotype connu avec chaque analyse, de manière à évaluer la validité de la procédure.
5. Si le carton du kit est endommagé, le contenu risque de l'être aussi ; ne pas utiliser le kit et contacter le service à la clientèle.

Symboles utilisés sur les étiquettes

Les symboles utilisés sur l'ensemble des étiquettes et conditionnements respectent la norme harmonisée ISO15223



Matériel fourni

Conserver tous les composants à l'obscurité, à une température n'excédant pas –20 °C. Les fluorochromes utilisés dans ce produit sont photosensibles, réduire au minimum leur exposition à la lumière. Éliminer 3 mois après l'ouverture.

Les réactifs doivent être stockés dans une zone exempte d'ADN contaminant ou de produit de PCR.

Tous les réactifs sont fournis prêts à l'emploi. Conserver les réactifs non ouverts et ouverts à –20 °C. Les réactifs ouverts peuvent être conservés pendant une durée maximum de 3 mois.

La quantité fournie est suffisante pour réaliser 50 (10) tests.

2 flacons de 120µl (50µl) de mélange d'amorce CF-EU2v1 A, contenant des amorces pour amplifier les allèles mutants suivants : R347H, R347P, 2789+5G>A, 3120+1G>A, 711+1G>T, R334W, I507del, F508del, 3849+10kbC>T, 1677delTA, 1078delT, V520F, L206W, W1282X, R560T, 2347delG, Q890X, R553X, G551D, S549N, M1101K, G542X, 3905insT, Y1092X(C>A), S1251N, 444delA, 1811+1.6kbA>G, 1717-1G>A, R117H, R117C, N1303K, Y122X, 394delTT, G85E, R1066C, 1898+1G>A, W846X, 2184delA, D1152H, CFTRdele2,3, P67L, 2143delT, E60X, 3659delC, 3272-26A>G, 621+1G>T, A455E, R1162X et R1158X. Ce mélange contient également des amorces de type sauvage pour la détection de l'allèle F508del normal, des amorces pour la détection des variants de la polythymidine IVS8-5T, IVS8-7T, IVS8-9T et des amorces pour l'identification de 2 marqueurs de séquences courtes répétées en tandem (short tandem repeats, STR) hypervariables – 404473 (450043).

2 flacons de 120µl (50µl) de mélange d'amorce CF-EU2v1 B, contenant des amorces de type sauvage pour amplifier les allèles normaux des mutants amplifiés par le mélange d'amorce A, à l'exception de l'allèle F508del normal qui est amplifié par les amorces incluses dans le mélange d'amorce A. Ce mélange contient également des amorces pour l'identification de 2 marqueurs STR hypervariables – 404474 (450044).

2 flacons de 400µl (75µl) de mélange principal PCR contenant de la HotStart Taq DNA Polymerase et des désoxynucléotides triphosphates dans du tampon – 404480 (450045).

1 flacon de 50 µl de contrôle ADN à 6 ng/l, normal pour les mutations détectées par Elucigene CF-EU2v1 – 404489

Matériel requis mais non fourni

Consommables de laboratoire – gants, tubes de micro-centrifugation avec bouchon à vis, flacons de PCR de 0,2 ml ou plaques de microtitration recommandés par le fabricant du thermocycleur utilisé,embouts de pipette.

Préparation de l'ADN – QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen GmbH, référence 51304/51306) ou équivalent.

Électrophorèse capillaire – marqueur de taille GeneScan 600 LIZ size standard (ABI N° de cat. 4366589), GeneScan 600v2 LIZ size standard (ABI N° de cat. 4408399), système multicapillaire DS-33 (ensemble de fluorochromes G5) matrice standard (ABI N° de cat. 4345833), polymère POP-7 (ABI N° de cat. 4352759), tampon d'analyseur génétique concentré 10x (ABI N° de cat. 402824) et formamide Hi-Di (ABI N° de cat. 4311320).

Remarque : S'assurer que tout le matériel utilisé se trouve dans les limites des dates de stabilité indiquées par le fabricant.

Équipement requis

Équipement de laboratoire – Pipettes de précision (2 ensembles : 1 pour la manipulation préalable à l'amplification et 1 pour la manipulation postérieure à l'amplification), vêtements de protection, vortexeur, micro-centrifugeuse, centrifugeuse à plaque de microtitration de 96 puits.

Amplification PCR – Thermocycleur adapté pour des plaques de microtitration de 96 puits ou des flacons de 0,2 ml avec une exactitude de température minimum de ± 1 °C dans la plage 33-100 °C et une uniformité statique de température de ± 1 °C.

Remarque : L'équipement du thermocycleur doit être régulièrement entretenu, conformément aux instructions du fabricant, et étalonné de manière à assurer un cyclage par PCR précis et des performances optimales. Le test Elucigene CF-EU2v1 a été élaboré sur des thermocycleurs Applied Biosystems 9700. D'autres marques et modèles doivent être entièrement testés et évalués pour assurer des performances optimales par l'utilisateur avant de signaler des résultats avec le CF-EU2v1.

Électrophorèse capillaire – Analyseur génétique ABI 3130/3500 (avec le logiciel d'analyse fragmentaire GeneMapper), rangée de capillaires de 36 cm ou 50 cm (ABI3500), plaques optiques de 96 puits, septas pour 96 puits, cassettes de 96 puits.

Remarque : L'équipement d'électrophorèse capillaire doit être régulièrement entretenu conformément aux instructions du fabricant et étalonné de manière à assurer des performances optimales.

Collecte et conservation des échantillons

Des échantillons de sang total (EDTA) et des spots de sang séché ont été évalués pour assurer qu'ils sont compatibles avec ce test.

Il a parfois été signalé que les dispositifs de collecte d'échantillon nuisent à l'intégrité de certains analytes et qu'ils pourraient interférer avec les technologies de certaines méthodes (9). Il est recommandé à chaque utilisateur de s'assurer que le dispositif choisi est utilisé conformément aux instructions du fabricant et que les dispositifs de collecte d'échantillon sont compatibles avec ce test.

Les échantillons de sang doivent être conservés à –20 °C avant la préparation de l'ADN. Éviter les congélations et décongélations répétées.

Préparation de l'ADN à partir d'échantillons de sang total (EDTA)

Les résultats obtenus sont réguliers avec de l'ADN extrait à l'aide du kit QIAamp 96 DNA Blood Kit (ou du kit QIAamp DNA Mini Kit avec de la protéinase K), en respectant le protocole décrit dans le manuel QIAamp, en partant de 200 µl de sang total liquide et en éluant dans 200 µl d'eau, grade biologie moléculaire.

Préparation d'ADN à partir de spots de sang séché

Les résultats obtenus sont réguliers avec de l'ADN extrait à l'aide du kit QIAamp DNA Mini Kit en respectant le protocole décrit dans le manuel QIAamp mais en partant de 2 disques de 3 mm d'un spot de sang séché et en éluant dans 100 µl d'eau, grade biologie moléculaire.
Il est recommandé d'évaluer minutieusement les autres méthodes d'extraction de l'ADN et types d'échantillon avec le test Elucigene CF-EU2v1 avant d'utiliser les résultats à des fins de diagnostic.

Considérations importantes – Quantité d'ADN
Avec des conditions PCR optimales et en utilisant les paramètres recommandés pour l'injection des échantillons (voir la remarque dans la section Électrophorèse capillaire), indiqués dans les modules de série de la colonne capillaire, des résultats acceptables ont été régulièrement obtenus avec l'ADN extrait en utilisant les méthodes indiquées ci-dessus à des concentrations entre 1,5 ng/µl et 25 ng/µl. La quantification de l'ADN est très importante ; la concentration de chaque échantillon d'ADN à tester doit être mesurée

pour assurer des résultats optimaux. Des techniques comme la fluorescence PicoGreen ou l'absorbance UV sont acceptables. À cause de la variation dans les techniques de quantification, l'utilisateur doit tenir compte des directives suivantes :

L'ajout de très grandes quantités d'ADN augmentera la probabilité que les pics de fond soient étiquetés par le logiciel d'analyse. Les étapes suivantes peuvent être réalisées pour réduire la probabilité que les pics de fond soient étiquetés.

- Diluer l'échantillon d'ADN et recommencer l'amplification
- Réduire la durée d'injection – voir la section Électrophorèse capillaire
- Augmenter le seuil d'amplitude du pic minimum – voir le document Guide du logiciel d'analyse Elucigene CF-EU2v1

L'ajout de faibles quantités d'ADN augmentera la probabilité que les pics de diagnostic soient faibles et ne soient pas étiquetés par le logiciel d'analyse. Les étapes suivantes peuvent être réalisées pour augmenter le signal.

- Augmenter la durée d'injection à 36 secondes (fortement recommandé pour les extractions à partir de sang séché sur papier filtre) – voir la section Électrophorèse capillaire
- Extraire de nouveau un échantillon à partir de sang séché sur papier filtre et éluer dans un volume réduit d'eau (50 µl)
- Augmenter le nombre de spots de sang séché pour extraction à 4 disques de 3 mm

Considérations importantes – Qualité de l'ADN

CF-EU2v1 est un test fortement multiplexé et nécessite une amplification PCR efficace pour fonctionner de manière optimale. La qualité de l'ADN peut déterminer l'efficacité du processus PCR. Les inhibiteurs extraits ensemble avec l'échantillon d'ADN peuvent entraîner une amplification sous-optimale menant à des pics faibles et mal équilibrés. Elucigene Diagnostics a validé l'utilisation du QIAamp 96 DNA Blood Kit et du QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH) avec le kit CF-EU2v1. D'autres kits ou méthodes d'extraction de l'ADN doivent être validés et optimisés pour une utilisation avec CF-EU2v1.

Remarque : *Voir le Guide de dépannage Elucigene CF-EU2v1 pour des informations supplémentaires.*

Protocole de test

Contrôle de la contamination par PCR

Le processus PCR génère un grand nombre de produits amplifiés (amplicons) et comporte un risque élevé de contamination susceptible d'entraîner des résultats faux. La contamination peut provenir de deux sources :

Contamination croisée – contamination de l'échantillon avec du matériel non amplifié provenant de l'environnement, ou d'autres échantillons qui contiennent la séquence cible.

Contamination du produit final – contamination de l'échantillon avec des amplicons provenant de PCR antérieures menant à l'amplification des amplicons cible et des amplicons contaminants.

Les laboratoires réalisant la PCR doivent tenir compte de ces sources de contamination et avoir en place des procédures qui réduisent considérablement le risque de contamination. Les méthodes destinées à contrôler la contamination sont bien documentées (10) et comprennent la conception physique des laboratoires, le déroulement des opérations, les procédures de manipulation des échantillons et des approches chimiques et enzymatiques. De bonnes procédures de laboratoire bien définies sont essentielles pour contrôler la contamination par PCR et doivent être mises en place avant de tester les échantillons cliniques.

Procédure d'amplification

Remarque : *Afin de minimiser le risque de contamination, les étapes 3 à 5 doivent être effectuées dans une zone exempte de produit PCR, de préférence dans un cabinet à flux laminaire.*

1. *Programmer le thermocycleur pour un cycle à étape unique pour activer la HotStart Taq à 94 °C pendant 20 minutes, relié à un programme de thermocyclage d'amplification de 1 minute à 94 °C (dénaturation), 2 minutes à 58 °C (renaturation) et 1 minute à 72 °C (extension) pendant 30 cycles. Cela peut être associé à un fichier retardé de 20 minutes à 72 °C (extension) pendant le cycle final.*
2. *Un contrôle négatif doit être inclus dans chaque série PCR.*
3. *Décongeler les mélanges d'amorce et le mélange principal PCR et centrifuger brièvement pour recueillir le contenu au fond des flacons. Mélanger doucement en agitant au vortexeur et en centrifugeant brièvement les flacons une nouvelle fois. Préparer assez de mélange réactif pour la quantité d'échantillons et de contrôles à tester (tableau 1).*

   Remarque : Le mélange principal PCR est visqueux et il est important d'assurer que les volumes corrects sont manipulés. Il est recommandé d'ajouter le mélange principal PCR aux mélanges d'amorce distribués auparavant pour assurer que tout le liquide est distribué de la pipette dans le mélange d'amorce.

   Remarque : Ne pas utiliser de mélanges différents ou de composants provenant de lots différents du kit CF-EU2v1.

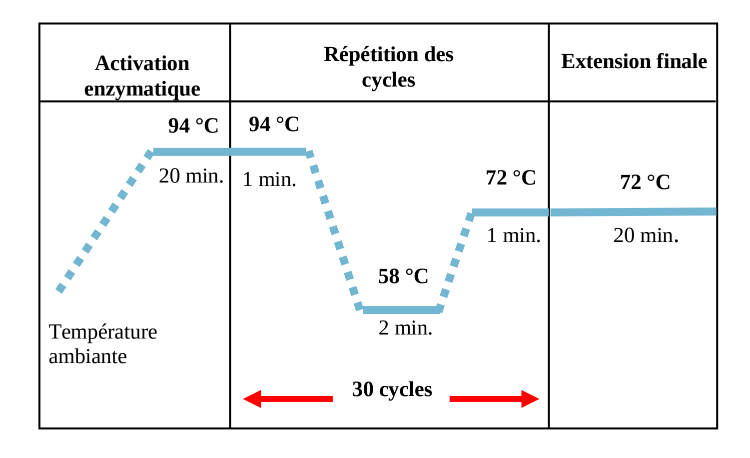


Tableau 1 : Formulation du mélange réactif

	Quantité d'échantillons à tester			
	1	10	25	50
Mélange d'amorce (µl)	4,5	45	112,5	225
Mélange principal PCR(µl)	7,5	75	187,5	375
Total (µl)	12	120	300	600

4. *Distribuer 10 µl de chaque mélange réactif au fond de flacons PCR de 0,2 ml ou de plaques correctement étiquetés.*
5. *À l'aide d'embouts de pipette distincts, ajouter 2,5 µl d'échantillon d'ADN à tester à chaque flacon et fermer les bouchons. Ne pas ajouter d'ADN au flacon de contrôle négatif, remplacer par 2,5 µl d'eau désionisée stérile.*
6. *Centrifuger brièvement les flacons PCR pour recueillir le contenu au fond des flacons.*
7. *Placer fermement les flacons dans le bloc du thermocycleur. Lancer le cycle à étape unique à 94 °C, suivi par le programme de cycles d'amplification.*
8. *À la fin du programme de cycles d'amplification, les échantillons peuvent être conservés à température ambiante jusqu'au lendemain ou à 2-8 °C pendant une durée maximum de 7 jours à l'obscurité avant leur analyse par électrophorèse capillaire.*

Électrophorèse capillaire

Il est recommandé à chaque utilisateur de s'assurer que l'équipement d' électrophorèse capillaire choisi est utilisé conformément aux instructions du fabricant et qu'il est compatible avec ce test. Dans cette situation, les paramètres clés sont le polymère et la rangée de capillaires. Les conditions d'électrophorèse capillaire suivantes permettent d'obtenir des résultats optimaux.

1. *Mélanger 6,8 µl de marqueur de taille GS600v2 LIZ size standard à 250 µl de formamide Hi-Di et agiter vigoureusement (mélange suffisant pour 16 puits). Distribuer 15 µl du mélange dans chaque puits d'une plaque pour PCR de 96 puits.*
2. *Ajouter 3 µl de produit PCR provenant de chacune des amplifications des mélanges A et B pour séparer les puits contenant le mélange de marqueur de taille/formamide (de l'étape 1) déjà distribué dans la plaque.*
3. *Dénaturer le produit PCR distribué dans la plaque pour PCR sur un thermocycleur avec les paramètres suivants : 94 °C pendant 3 minutes puis 4 °C pendant 30 secondes.*
4. *Centrifuger brièvement la plaque pour recueillir le contenu au fond des flacons et pour éliminer toute bulle des puits, puis charger immédiatement sur l'analyseur génétique.*

Remarque : Les paramètres d'injection des échantillons peuvent être modifiés pour s'adapter à la quantité d'amplicon produite au cours de la PCR, qui peut varier en fonction de la quantité d'ADN génomique ajoutée. Une quantité moindre d'amplicon peut être ajoutée à la colonne pour analyse en réduisant soit la durée soit la tension d'injection. À l'inverse, une quantité plus élevée d'amplicon peut être ajoutée à la colonne pour analyse en augmentant soit la durée soit la tension d'injection. Les échantillons amplifiés auparavant peuvent être réinjectés de nombreuses fois pour une nouvelle analyse – voir le Guide de dépannage Elucigene CF-EU2v1 pour des informations supplémentaires.

Instruments ABI 3130 :

Un module de série CF-EU2 et un protocole doivent être créés et pourront ensuite être réutilisés pour chaque série CF-EU2.

Créer le module de série CF-EU2 dans le **Module Manager** *(gestionnaire de module) du logiciel de collecte de données du 3130. S'assurer que les options suivantes sont sélectionnées.*

- *Type : Regular (Normal)*
- *Template (Matrice) : FragmentAnalysis36_POP7*
- *Saisir les paramètres détaillés dans le tableau ci-dessous.*

Module de capillaires de 36 cm

#	Nom du paramètre	Valeur	Fourchette
1	Oven Temperature (Température de l'étuve)	60	Entre 18 et 65 °C (entier)
2	Poly_Fill_Vol. (Volume de remplissage poly)	6500	Entre 6 500 et 38 000 étapes
3	Current Stability (Stabilité du courant)	5,0	Entre 0 et 2 000 uAmps (entier)
4	PreRun_Voltage (Tension avant série)	15,0	Entre 0 et 15 kVolts
5	Pre_Run_Time (Durée avant série)	180	Entre 1 et 1 000 s
6	Injection_Voltage (Tension d'injection)	3,0	1…15 Entre 0 et 15 kVolts
7	Injection_Time (Durée d'injection)	12,0**	1…600 entre 1 et 1 000 s
8	Voltage_Number_Of_Steps (Nombre d'étapes de tension)	20	Entre 1 et 100 nk
9	Voltage_Step_Interval (Intervalle d'étape de tension)	15	1…60 entre 1 et 1 000 s
10	Data_Delay_Time (Délai d'attente des données)	60	Entre 1 et 3 600 s
11	Run_Voltage (Tension de série)	15,0	Entre 0 et 15 kVolts
12	Run_Time (Durée de la série)	1200	300…14 000 entre 1 et 1 000 s

****** Augmenter la durée d'injection à 36 secondes pour l'analyse de l'ADN extrait à partir de sang séché sur papier filtre

Remarque : La « durée de série » requise variera selon la température ambiante du lieu d'installation de l'analyseur génétique. Pour des informations supplémentaires sur la création de modules de série, consulter le Manuel d'utilisation de l'analyseur génétique Applied Biosystems 3130.

Créer le protocole CF-EU2 dans le **Protocol Manager** *(gestionnaire de protocole), en s'assurant que les paramètres suivants sont sélectionnés :*

- *Type : Regular (Normal)*
- *Run Module (Module de série) : CF-EU2 (voir module de série ci-dessus)*
- *Dye Set (Ensemble de fluorochromes) : G5*

Pour traiter les échantillons, créer une fiche d'échantillon à l'aide du **Plate Manager** *(gestionnaire de plaque), s'assurer que le protocole d'instrument sélectionné convient pour CF-EU2v1 (voir ci-dessus).*

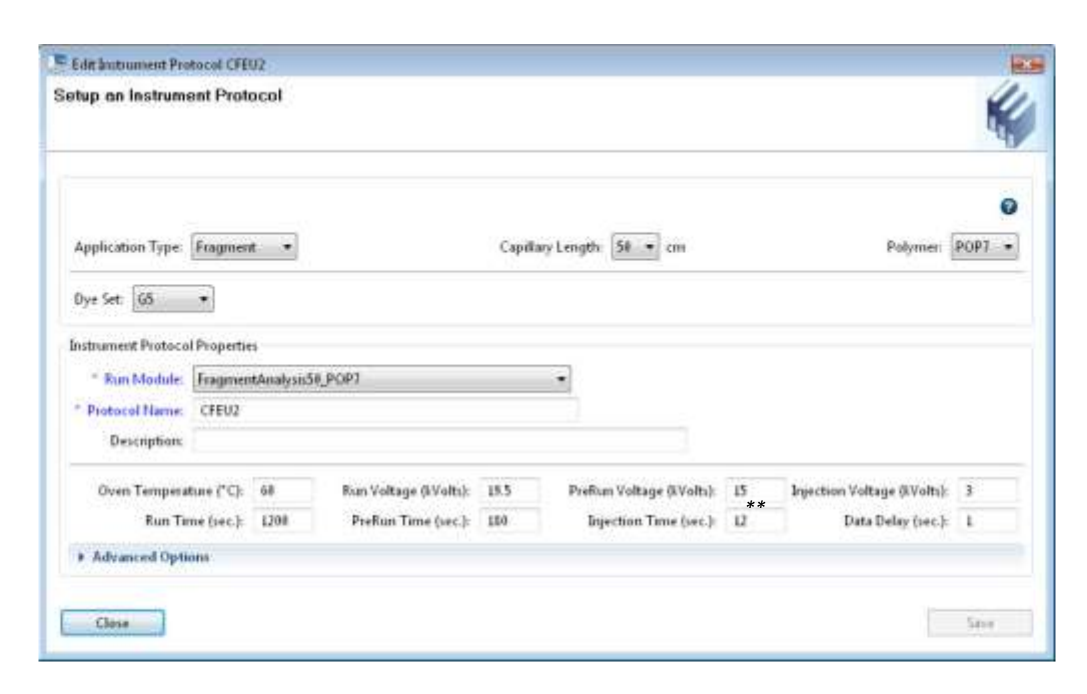
Remarque : Pour des informations supplémentaires sur la configuration, le fonctionnement et le dépannage de l'instrument, consulter le Manuel d'utilisation de l'analyseur génétique Applied Biosystems 3130.

Instruments ABI 3500 :

Un **Instrument Protocol** *(protocole d'instrument) CF-EU2 doit être créé et pourra ensuite être réutilisé pour chaque série CF-EU2v1.*

Créer le **Instrument Protocol** *(protocole d'instrument) CF-EU2 à l'aide de la bibliothèque de protocoles du 3500. S'assurer que les options suivantes sont sélectionnées.*

- *Run Module (Module de série) : FragmentAnalysis50_POP7*
- *Saisir les paramètres indiqués sur l'image ci-dessous.*



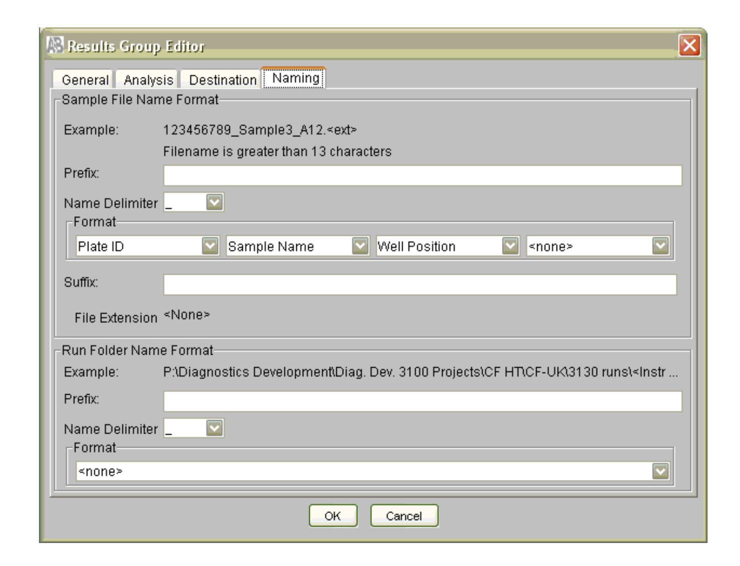
****** Augmenter la durée d'injection à 36 secondes pour l'analyse de l'ADN extrait à partir de sang séché sur papier filtre

Pour traiter les échantillons, créer une plaque d'échantillons en cliquant sur **« Create Plate from Template »** *(créer plaque à partir de la matrice) sur le* **« Dashboard »** *(tableau de bord), s'assurer que le protocole adéquat pour CF-EU2v1 a été affecté (voir ci-dessus).*

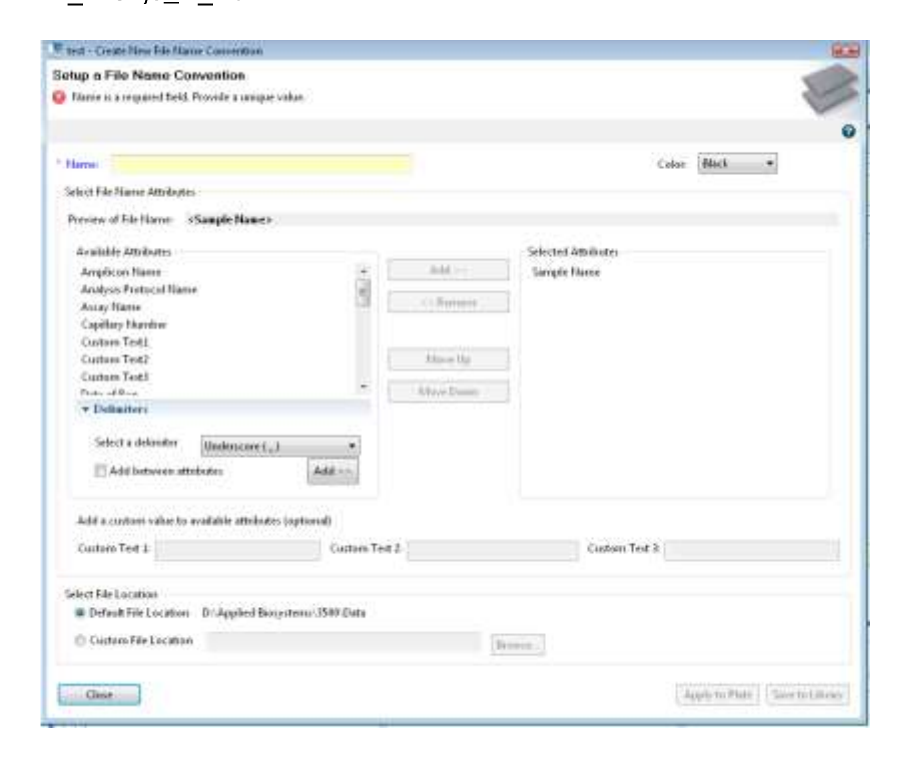
Préparation de la fiche d'échantillon pour GeneMarker :

Le logiciel GeneMarker permet la comparaison directe entre les données A et B d'une même personne. Pour faciliter ceci, il est important que la dénomination du fichier de sortie de données brutes (fsa) soit cohérente entre tous les échantillons et les mélanges. La fiche d'échantillon doit contenir l'identifiant unique de l'échantillon pour chaque échantillon testé, avec le suffixe _A ou _B selon le mélange testé. Si l'identifiant de plaque doit être inclus dans le nom fsa, un format identique doit être utilisé à chaque fois, par ex. CFEU2 JJMMAAAA.

Sur le **3130**, les paramètres « Results Destination » (destination des résultats) doivent être définis pour que le nom de l'échantillon soit inclus dans le nom du fichier fsa, par ex., CFEU2 JJMMAAAA_**1234,5_A**_A01.



Sur le **3500**, la convention de dénomination des fichiers doit être définie pour que le nom de l'échantillon soit inclus dans le nom du fichier fsa, par ex. CFEU2 JJMMAAAA_**1234,5_A**_A01.



Interprétation des résultats

Au cours de la collecte des données, les fragments PCR seront observés sous forme de pics bleus (mutants) ou verts (type sauvage) sur l'électrophérogramme des données brutes. Une personne a deux copies du gène CFTR. Quand ces copies ont la même séquence pour un allèle donné, la personne est décrite comme étant homozygote pour ce site. Quand les copies ont une séquence différente pour un site donné, la personne est décrite comme étant hétérozygote.

Une fois la collecte des données terminée, les fragments PCR CF-EU2v1 doivent être mesurés par rapport au marqueur de taille GS600v2 LIZ size standard à l'aide du logiciel d'analyse de fragment.

Le document Elucigene CF-EU2v1 Guide du logiciel d'analyse fournit des recommandations détaillées supplémentaires sur les paramètres du logiciel, l'analyse et l'interprétation. Les procédures du Guide du logiciel d'analyse sont disponibles pour les logiciels GeneMapper et GeneMarker sur le site Internet Elucigene Diagnostics :

www.elucigene.com/products

Les résultats du mélange A (mutant) déterminent si une personne porte une mutation, indiquée par la présence d'un pic bleu. Le mélange mutant contient également des amorces de l'allèle normal F508 ; ce mélange peut donc déterminer si une personne est normale pour F508 (pic vert uniquement), homozygote pour l'allèle mutant F508del (pic bleu uniquement) ou hétérozygote pour F508del (pics bleu et vert).

Si une autre mutation est observée, les résultats du mélange B (type sauvage) peuvent être analysés pour déterminer le statut homozygote ou hétérozygote. La présence d'un pic vert pour l'allèle donné du mélange de type sauvage indique que la personne est hétérozygote, et l'absence du pic vert indique que la personne est homozygote pour cette mutation particulière.

Les marqueurs STR hypervariables (rouges) sont présents dans les deux mélanges. Ceci permet la comparaison entre l'échantillon amplifié avec le mélange mutant et l'échantillon amplifié avec le mélange de type sauvage et réduit la possibilité de confusion d'échantillon. Un profil STR différent dans chacun des deux mélanges est le signe d'une confusion d'échantillon. L'absence de ces marqueurs STR indique un échantillon invalide. La présence des marqueurs STR à très faible rfu indique un échantillon faible devant être analysé avec précaution.

Remarque : Voir le guide de dépannage pour des informations supplémentaires.

Marqueurs détectés

Le tableau ci-dessous résume les marqueurs détectés par le mélange CF-EU2v1. Les marqueurs sont énumérés selon la plage de taille du produit PCR observé.

Marqueurs détectés

Marqueur (Pic n°)	Marqueur	Plage de taille du produit pb (données 3130/POP7)
01	R347H	110.5-116.5
02	R347P	117-123
03	2789+5G>A	124-130
04	3120+1G>A	132.5-138.5
05	711+1G>T	141.5-147.5
06	R334W	147.5-154
07	I507del	156-162.5
08	F508del	163-169
09	3849+10KbC>T	172-178
10	1677delTA	180-188.5
11	1078delT	193-199
12	V520F	206-211.5
13	L206W	215-220
14	W1282X	224.5-230.5
15	R560T	234.5-240.5
16	2347delG	242-246
17	Q890X	250-252
18	R553X	255.5-261.5
19	G551D	265-267
20	S549R(T>G)*	267.5-269.5
21	S549N	275-280
22	M1101K	282-288
23	G542X	289-295.5
24	3905insT	297-303.5
25	Y1092X(C>A)	308-314
26	S1251N	315-321
27	444delA	323-326
28	1811+1.6kbA>G	332-338
29	1717-1G>A	341.5-347.5
30	R117H	349-355
31	R117C	357-360
32	N1303K	360-366.5
33	Y122X	367-373
34	394delTT	377-383
35	G85E	384-390
36	R1066C	391-397
37	1898+1G>A	398.5-404.5
38	W846X	406-411
39	2184delA	413-418
40	D1152H	423-429
41	CFTRdel2,3	433-439
42	P67L	439.5-445.5
43	2143delT	446-450.5
44	E60X	453.5-460.5
45	3659delC	461-465.5
46	3272-26A>G	470-476
47	621+1G>T	485.5-491.5

Marqueur n°	Marqueur	Plage de taille du produit pb (données 3130/POP7)
48	A455E	496-503
49	R1162X	506-512
50	R1158X	516.5-524.5
5T**	IVS8-5T	110-130
7T	IVS8-7T	140-160
9T	IVS8-9T	175-195

***S549R(T>G)**

Le pic 20 est présent uniquement dans le mélange A.

**** Tailles de l'allèle 5T**

Marqueur	Plage de taille du produit pb (données 3130/POP7)
5T (9)	117.25 – 118.75
5T (10)	119.25 – 120.75
5T (11)	121.25 – 122.75
5T (12)	123.25 – 124.75
5T (13)	125.25 – 126.75

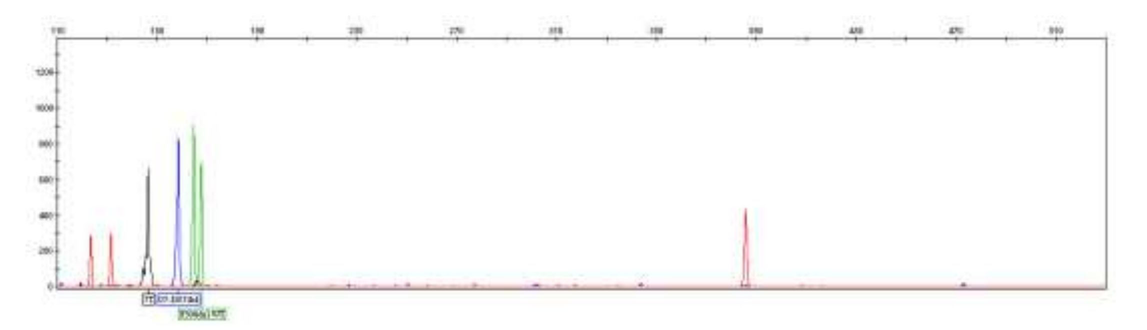
REMARQUE : Les tailles de marqueur peuvent varier selon l'instrument et le polymère utilisé.

Exemples d'interprétation

I507del

En raison de l'emplacement de la délétion I507del sur le gène CFTR, il est possible de détecter la présence de ce marqueur par un changement de 3 pb de la taille du pic F508del et par un pic spécifique du mutant I507del.
Si un seul allèle mutant I507del est présent, le pic I507del mutant sera observé sous forme d'un pic bleu à environ 159 pb. Un pic F508 de type sauvage sera observé comme étant présent, mais à environ la moitié de la hauteur du pic normalement associé à un génotype homozygote de type sauvage. Celui-ci est observé sous forme d'un pic vert à environ 167 pb. Un pic vert supplémentaire sera également observé à environ 164 pb.

Échantillon hétérozygote I507del

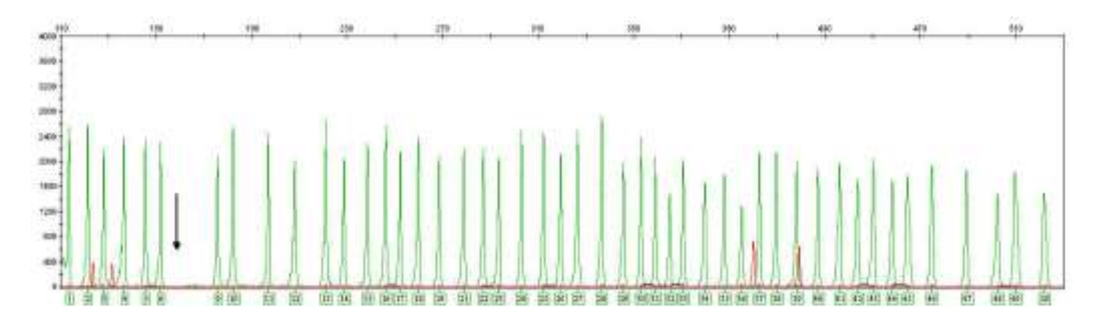


Un échantillon I507del/F508del comportera un pic vert F508del de type sauvage déplacé à environ 164 pb (3 pb de moins que la normale), un pic bleu F508del mutant à 166 pb et un pic bleu I507del mutant à environ 159 pb.

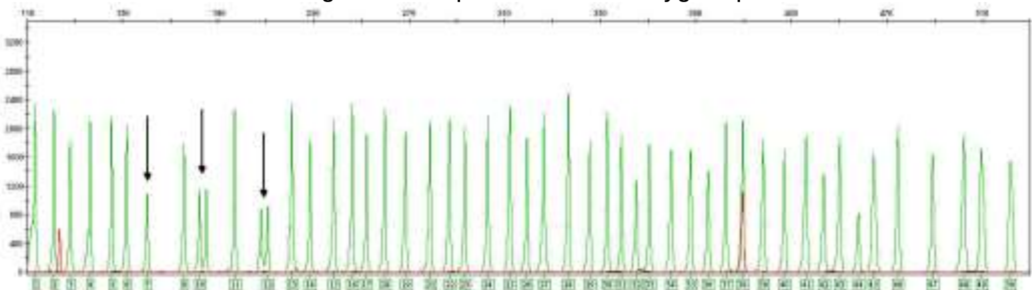
Un échantillon I507del/I507del comportera un pic bleu à environ 159 pb et un seul pic vert à environ 164 pb (3 pb plus petit que le pic F508 normal observé en l'absence de I507del).

F508del

La présence d'une mutation F508del empêche le fonctionnement de l'amorce I507del de type sauvage. Une personne homozygote pour F508del ne présentera donc pas de pic I507del de type sauvage dans le mélange de type sauvage (voir ci-dessous).



Une hauteur réduite du pic I507del de type sauvage et 2 pics séparés de 3 pb en positions 10 et 12 dans le mélange de type sauvage (voir ci-dessous) sera observée dans les résultats du mélange B d'une personne hétérozygote pour F508del.



Insertions et délétions

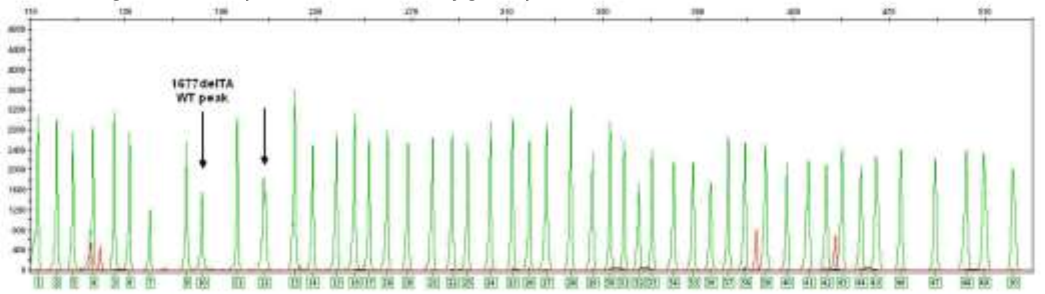
À cause de la nature de la conception du kit CF-EU2v1, la présence d'insertions ou de délétions entre deux amorces opposées entraînera des changements de la taille de tout l'amplicon produit entre ces deux amorces. Par conséquent, en plus des 50 mutations détectées par le kit CF-EU2v1, toutes les insertions et délétions dans les séquences cibles amplifiées peuvent être détectées par le changement de la taille d'amplicon attendue dans le mélange de type sauvage (B). Celles-ci ont été présentées sous forme de tableau et sont disponibles dans un document distinct sur le site Internet de Elucigene Diagnostics :

www.elucigene.com/products

Des exemples d'insertions et de délétions détectées par le kit et l'impact qu'elles ont sur le profil du mélange B sont montrés ci-dessous :

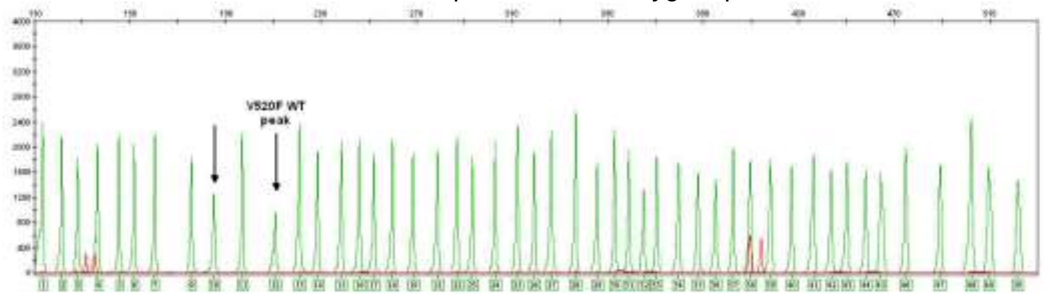
F508del/1677delTA

Deux pics séparés de 1 pb en position 12 (V520F WT) seront observés dans les résultats du mélange B d'une personne hétérozygote pour les mutations F508del/1677delTA.



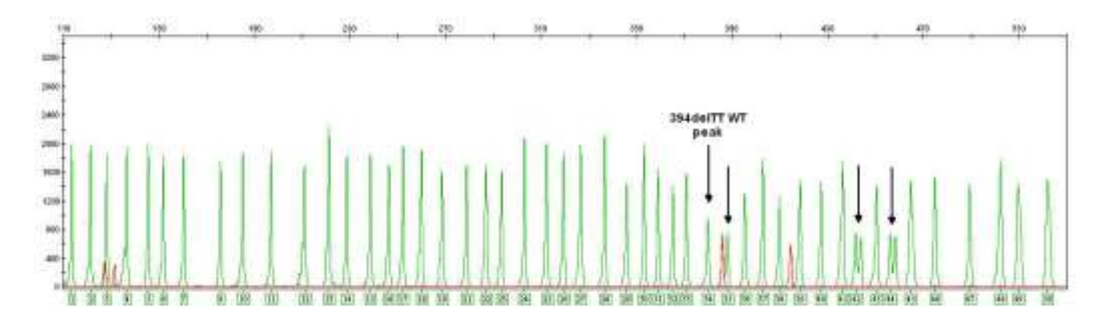
V520F

Un pic de type sauvage de hauteur réduite en position 10 (1677delTA WT) sera observé dans les résultats du mélange B d'une personne hétérozygote pour la mutation V520F, car celle-ci empêche l'amorce 1677delTA de type sauvage de fonctionner. Les pics 10 et 12 seront absents des résultats d'une personne homozygote pour la mutation V520F.



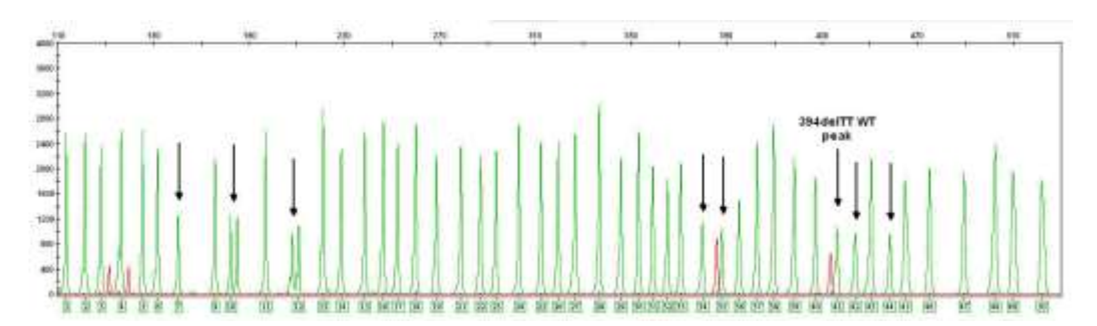
394delTT

Deux pics séparés de 2 pb aux positions 35 (G85E WT), 42 (P67L WT) et 44 (E60X WT) seront observés dans les résultats du mélange B d'une personne hétérozygote pour la mutation 394delTT. Le pic 34 sera absent et la hauteur des pics 35, 42 et 44 sera celle attendue mais leur taille sera réduite de 2 pb par rapport à la taille attendue dans les résultats d'une personne homozygote pour la mutation 394delTT.



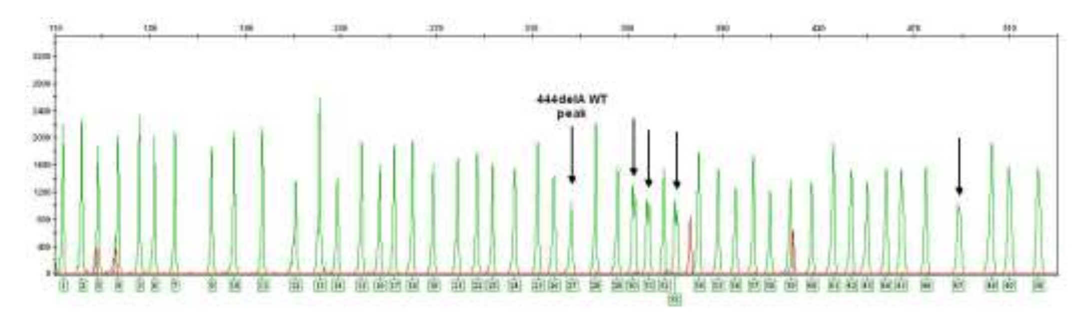
F508del/CFTRdele2,3

Des hauteurs de pic réduites aux positions 34 (394delTT), 35 (G85E WT), 41 (CFTRdele2,3 WT), 42 (P67L WT) et 44 (E60X WT) seront observées dans les résultats du mélange B d'une personne hétérozygote pour la mutation CFTRdele2,3. Les pics 34, 35, 41, 42 et 44 seront absents des résultats d'une personne homozygote pour la mutation CFTRdele2,3.



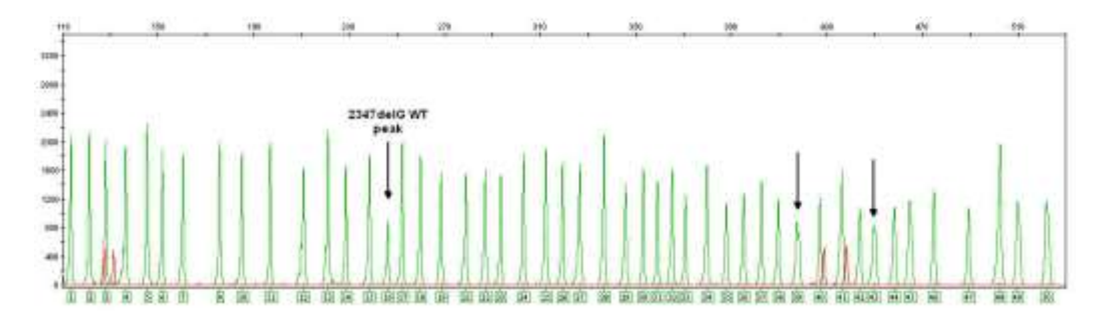
444delA

Deux pics séparés de 1 pb aux positions 30 (R117H WT), 31 (R117C WT), 33 (Y122X WT) et 47 (621+1 WT) seront observés dans les résultats du mélange B d'une personne hétérozygote pour la mutation 444delA. Le pic 27 sera absent et les pics 30, 31, 33 et 47 auront la hauteur attendue mais leur taille sera réduite de 1 pb par rapport à la taille attendue dans les résultats d'une personne homozygote pour la mutation 444delA.



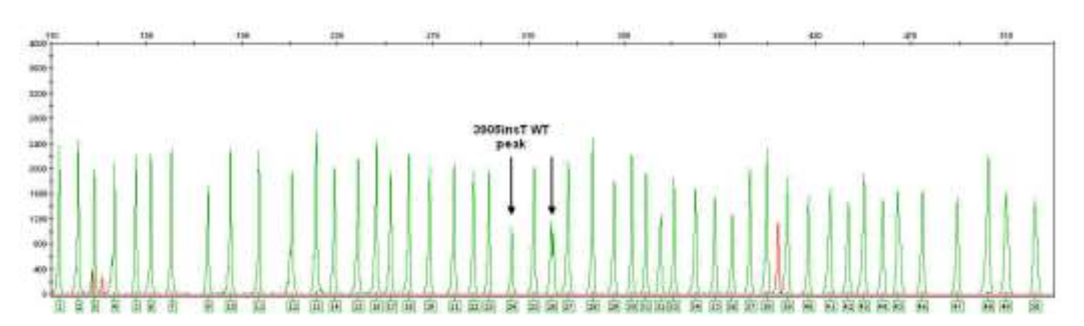
2347delG

Deux pics séparés de 1 pb aux positions 39 (2184delA WT) et 43 (2143delT WT) seront observés dans les résultats du mélange B d'une personne hétérozygote pour la mutation 2347delG. Le pic 16 sera absent et les pics 39 et 43 auront la hauteur attendue mais leur taille sera réduite de 1 pb par rapport à la taille attendue dans les résultats d'une personne homozygote pour la mutation 2347delG.



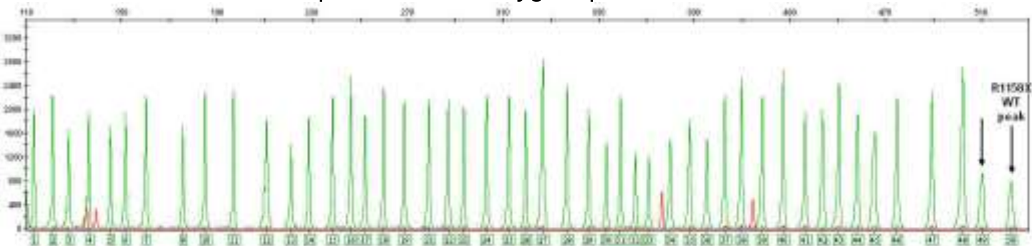
3905insT

Deux pics séparés de 1 pb en position 26 (S1251N WT) seront observés dans les résultats du mélange B d'une personne hétérozygote pour la mutation 3905insT. Le pic 24 sera absent et le pic 26 aura la hauteur attendue mais sa taille sera augmentée de 1 pb par rapport à la taille attendue dans les résultats d'une personne homozygote pour la mutation 3905insT.



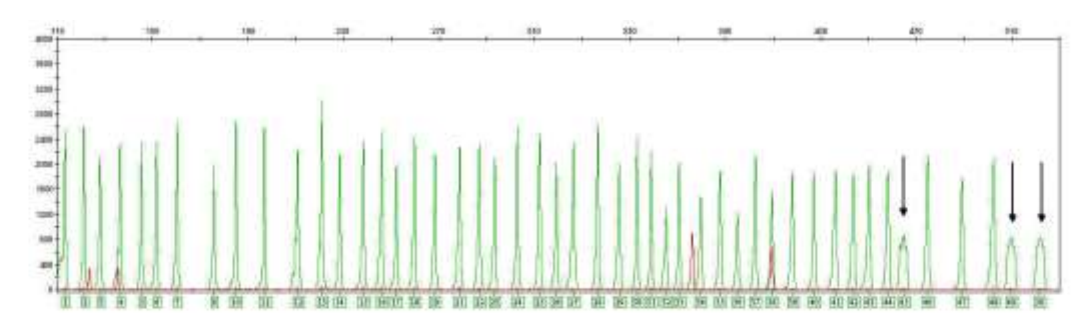
R1158X

Une hauteur de pic réduite en position 49 (R1162X WT) sera observée dans les résultats du mélange B d'une personne hétérozygote pour la mutation R1158X. Le pic 49 sera absent des résultats d'une personne homozygote pour la mutation R1158X.



Polymorphisme rs4148721 (delAT) dans l'intron 22

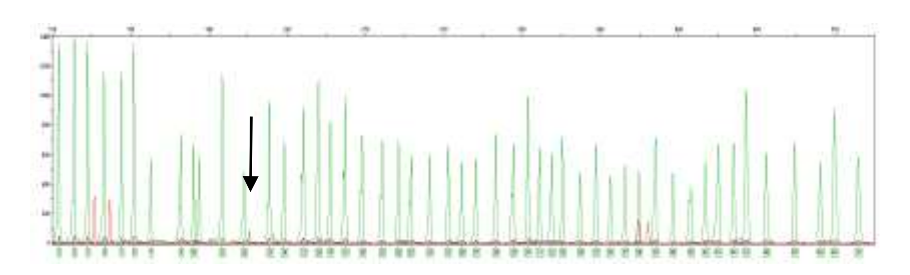
Deux pics séparés de 2 pb aux positions 45 (3659delC WT), 49 (R1162X WT) et 50 (R1158X WT) seront observés dans les résultats du mélange B d'une personne hétérozygote pour le polymorphisme rs4148721 (délétion de AT) dans l'intron 22. Les pics 45, 49 et 50 auront la hauteur attendue mais leur taille sera réduite de 2 pb par rapport à la taille attendue dans les résultats d'une personne homozygote pour le polymorphisme rs4148721.



Autres observations

V520F – Polymorphisme 1584G>A dans l'exon 12

Le polymorphisme 1584G>A a été identifié comme interférant avec l'amplification de la séquence V520F de type mutant et sauvage. Une hauteur de pic réduite en position 12 (V520F) sera observée dans le mélange B d'une personne hétérozygote pour le polymorphisme 1584G>A. Le pic 12 sera absent du mélange B d'une personne homozygote pour le polymorphisme 1584G>A. Une personne qui est hétérozygote pour la mutation F508del et également hétérozygote pour la mutation 1584G>A présentera un seul pic 12 dans le mélange B plutôt que les deux pics attendus en position 12 observés normalement dans un hétérozygote F508del – voir l'exemple ci-dessous. Le pic 12 sera absent du mélange A d'une personne hétérozygote pour la mutation V520F et le polymorphisme 1584G>A sur le même allèle ; un résultat de ce type n'a pas été observé jusqu'à ce jour et il est probable qu'il s'agit d'une association rare.



Réactivité croisée

Tous les efforts possibles ont été faits au cours du développement pour éviter que la présence d'autres polymorphismes et mutations rapportés dans le gène CFTR interfère sur la fonction du test.

La réactivité croisée a été étudiée sur la mutation rare R1283M, qui n'a pas été détectée par le kit Elucigene CF-EU2v1. En outre, les polymorphismes suivants n'ont pas été détectés par le test : 1655T/G (F508C), 1651A/G.

L'évaluation des mutations et polymorphismes connus sur le gène CFTR a souligné les effets suivants sur les résultats du kit Elucigene CF-EU2v1.

1. L'amorce du mutant G551D dans le mélange A détecte également la mutation S549RT>G. Le logiciel d'analyse étiquettera celle-ci en tant que pic n° 20. Il n'y aura pas de pic correspondant de type sauvage dans le mélange B.
2. L'amorce du mutant 2184delA dans le mélange A réagira de manière croisée avec la séquence ADN du mutant 2183AA>G et résultera en un pic mutant à la position de 2184delA.
3. L'amorce du mutant 1078delT dans le mélange A réagira de manière croisée avec la séquence ADN du mutant F316L et résultera en un pic mutant à la position de 1078delT.
4. L'amorce du mutant R347P dans le mélange A réagira de manière croisée avec la séquence ADN du mutant R347H et résultera en un pic mutant à la position de R347P, d'une hauteur réduite par rapport au pic R347P réel.
5. La présence du polymorphisme F508C (1655T>G) résultera en un pic I507del de hauteur réduite dans le mélange B CF-EU2v1.
6. La présence de R117H résultera en un pic R117C de hauteur réduite dans le mélange B CF-EU2v1. Dans un échantillon homozygote pour R117H, le pic R117C sera absent.
7. La présence de G85E résultera en un pic 394delTT de hauteur réduite dans le mélange B CF-EU2v1. Dans un échantillon homozygote pour G85E, le pic 394delTT sera absent.
8. Un très petit pic artéfact à la position de I507del peut parfois être observé dans les résultats d'un hétérozygote F508del et en particulier dans un échantillon homozygote F508del.
9. La possibilité de réactivité croisée des mutations suivantes n'a pas été vérifiée en raison de l'absence de disponibilité d'échantillons pertinents. Celles-ci pourraient interférer avec le fonctionnement du test : R117P, R117L, 1717-2A>G, 621+2T>C, 621+2T>G, R553G, R553Q, R347L, I506T, I506S, I506V et l'association rare de I507del avec le polymorphisme 1651A/G.

Caractéristiques des performances

Cent dix échantillons d'ADN, extraits à partir de sang total liquide (EDTA), ont été testés en aveugle avec Elucigene CF-EU2v1. Cinq échantillons étaient invalides après la PCR en raison d'une faible concentration en ADN (moins de 1,5 ng/µl). Parmi les échantillons ayant donné des résultats interprétables, 96 étaient normaux, 5 étaient hétérozygotes pour F508del, 1 était hétérozygote pour 1717-1G>A, 1 était hétérozygote pour G551D, 1 était hétérozygote pour 621+1G>T, 1 était hétérozygote pour G542X et 1 était hétérozygote composite pour G542X/F508del.

Quatre-vingt-onze échantillons d'ADN, extraits à partir de spots de sang séché ont été testés en aveugle avec Elucigene CF-EU2v1. L'amplification a échoué pour cinq échantillons. Sur les échantillons dont l'amplification a réussi, 20 n'ont pas satisfait les critères d'analyse pour l'interprétation après une deuxième injection de 12 secondes sur un analyseur génétique 3 500 ; tous les échantillons invalides l'étaient en raison d'une faible concentration en ADN (moins de 1,5 ng/µl). Les 20 échantillons invalides ont été

réinjectés pendant 36 secondes sur l’analyseur génétique 3 500 et analysés ; 7 échantillons n’ont pas satisfait les critères d’analyse pour l’interprétation. Parmi les 79 échantillons ayant donné des résultats interprétables, 38 étaient normaux, 5 étaient hétérozygotes pour F508del, 3 étaient hétérozygotes pour G551D, 3 étaient hétérozygotes pour W1282X, 2 étaient hétérozygotes pour D1152H et 2 étaient hétérozygotes pour G542X. Quatre hétérozygotes composites, 3120+1G>A/F508del, R117H/F508del, R1162X/F508del et R553X/F508del ont également été déterminés. De plus, chacun des échantillons hétérozygotes suivants a été observé une seule fois, E60X, G85E, 394delTT, Y122X, 621+1G>T, 1078delT, R334W, R347P, A455E, I507del, 1717-1G>A, R553X, 1811+1.6kbA>G, 1898+1G>A, 2184delA, W846X, 3272-26A>G, Y1092X, 3659delC, 3849+10kbC>T, S1251N et N1303K.

Quarante-six échantillons d’ADN représentant les 50 mutations détectées par le kit CF-EU2v1 ont été amplifiés à cinq occasions distinctes. Tous les échantillons ont donné les résultats attendus avec aucun résultat faux-négatif ou faux-positif, ce qui démontre une spécificité et une sensibilité cliniques de 100 %.

Dépannage

Ce mode d’emploi est fourni pour assurer des performances optimales du test. Les utilisateurs ne doivent pas s’écarter des procédures fournies. Tout écart risque d’entraîner des performances sous-optimales et de produire des données de qualité médiocre. Un guide de dépannage est disponible à la demande auprès de Elucigene Diagnostics et fournit des exemples et des solutions à certaines des observations les plus fréquentes concernant Elucigene CF-EU2v1 ; elles comprennent notamment :

- Pas de pics de diagnostic ou STR
- Pics de diagnostic ou STR faibles
- Excès de pics de refoulement/de fond
- Pics sans étiquette
- Pics FAM (mutants) faibles
- Profil déséquilibré du mélange A
- Profil déséquilibré du mélange B
- Pics divisés dans le profil du mélange B

Pour obtenir un exemplaire du Guide de dépannage Elucigene CF-EU2v1, consulter notre service technique :
T: +44 (0) 161 669 8122
F: +44 (0) 161 669 8129
E: enquiries@elucigene.com
E: techsupport@elucigene.com

Limites de la procédure

1. Les résultats obtenus par ce test de diagnostic ou tout autre test de diagnostic doivent être utilisés et interprétés uniquement dans le contexte du tableau clinique global. Elucigene Diagnostics ne pourra être tenu responsable des décisions cliniques prises.
2. L’absence de détection de mutations par ce kit ne garantit pas l’absence d’autres mutations du gène CFTR. Il existe d’autres mutations qui ne sont pas détectées par ce kit.
3. La fréquence des mutations varie selon les populations. Les données de fréquence de mutation dans les populations sont disponibles auprès du Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium (6).

L’utilisateur de ce kit doit insister sur ces points au moment de rendre compte des résultats au clinicien ou au conseiller génétique demandant le diagnostic.

Exonération de responsabilité

Les résultats de ce test et d'autres tests diagnostics doivent être interprétés en association avec d'autres données de laboratoire et cliniques à la disposition du clinicien.

Ces réactifs Elucigene sont fournis pour des tests de diagnostic in vitro.

Des détails supplémentaires concernant l'interprétation des données sont disponibles dans les procédures du Guide du logiciel d'analyse Elucigene CF-EU2v1 :

www.elucigene.com/products

Bibliographie

1. Rosenstein BJ, Cutting GR. The diagnosis of cystic fibrosis: a consensus statement. Cystic Fibrosis Foundation Consensus Panel. *J Pediatr*. 1998;132:589–95.

2. De Braekeleer M, Allard C, Leblanc JP, Simard F, Aubin G. Genotype-phenotype correlation in cystic fibrosis patients compound heterozygous for the A455E mutation. *Hum Genet*. 1997;101:208–11

3. Drumm ML, Konstan MW, Schluchter MD, Handler A, Pace R, Zou F, Zariwala M, Fargo D, Xu A, Dunn JM, Darrah RJ, Dorfman R, Sandford AJ, Corey M, Zielenski J, Durie P, Goddard K, Yankaskas JR, Wright FA, Knowles MR. Genetic modifiers of lung disease in cystic fibrosis. *N Engl J Med*. 2005;353:1443–53

4. Goss CH, Newsom SA, Schildcrout JS, Sheppard L, Kaufman JD. Effect of ambient air pollution on pulmonary exacerbations and lung function in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;169:816–21

5. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, and Tsui LC. « Identification of the Cystic Fibrosis Gene: Genetic Analysis. » *Science* 1989; **245** (4922): 1073-8

6. Cystic Fibrosis Mutation Database, www.genet.sickkids.on.ca/cftr/app

7. Joshua D. Groman et al. Variation in a Repeat Sequence Determines Whether a Common Variant of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene Is Pathogenic or Benign. Am J Hum Genet. 2004; 74(1): 176–179.

8. Newton CR et al. Analysis of any point mutation in DNA. The Amplification Refractory Mutation System (ARMS). Nucleic Acid Res 17: 2503-2516 (1989).

9. Satsangi J et al. Effect of heparin on polymerase chain reaction. Lancet 343:1509-1510 (1994).

10. PCR Primer: A Laboratory Manual, 2nd edition. ColdSpring Harbour Laboratory Press: Section 1

REMARQUE À L'ATTENTION DE L'ACHETEUR : LICENCE RESTREINTE
Les polynucléotides marqués par les fluorochromes VIC, NED et PET et/ou leur utilisation peuvent être protégés par un ou plusieurs brevets appartenant à Life Technologies Corp. Le prix d'achat de ce produit comprend des droits limités non transférables conformément à certaines demandes de brevets appartenant à Life Technologies Corp. pour l'utilisation de cette quantité de produit destinée uniquement aux activités de détection des cibles de l'acheteur dans le cadre d'un diagnostic humain. Aucun autre droit n'est octroyé. De plus amples informations sur les licences d'achat concernant les fluorochromes mentionnés plus haut peuvent être obtenues en contactant le Directeur des licences, outlicensing@lifetech.com.